

FLÁVIA SEJAS

ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DE ENZIMAS PRODUZIDAS PELO FUNGO
ENDOFÍTICO ENTOMOPATOGÊNICO *Paecilomyces* sp. ISOLADO DA SOJA
(*Glycine max* (L.) Merrill).

Monografia apresentada à disciplina de
Estágio em Patologia Básica como
requisito parcial à conclusão do curso de
Bacharelado em Ciências Biológicas,
Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadores: Prof^a Dra. Ida Chapaval
Pimentel
Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Curitiba
2002

Agradeço a Deus pelo amparo nas horas mais difíceis e eu sei Senhor, que em ti posso confiar.

Especialmente a minha mãe e ao meu esposo, pelo carinho, apoio e compreensão, obrigada, sem vocês não teria conseguido.

AGRADECIMENTOS

A toda minha família pelo carinho, incentivo, confiança e amizade. Obrigada por vocês estarem comigo em todas as horas.

À minha querida orientadora e amiga Prof^a. Ida Chapaval Pimentel, que para além dos ensinamentos preciosos, deu-me apoio, amizade, confiança e estímulo para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Dr. Carlos Ricardo Soccol pelo apoio e sugestões ao trabalho.

Ao especial amigo João Novakovich, pela valiosa ajuda em todo este trabalho, além da sincera amizade, compreensão e agradável convivência.

Às amigas especiais Iriana, Letizia e Roxana, por estarem sempre ao meu lado, ajudando, incentivando e confiando, que nossa amizade seja duradoura.

Aos amigos e colegas do laboratório de Microbiologia: Letizia, Michelle, Ângela, Cíntia, Rodrigo, Fábio, Carlos, Anousca e João por terem tornado o trabalho no laboratório mais descontraído.

ÀS professoras do laboratório Marita, Ilma e Vânia pela ajuda e empréstimo de equipamentos.

À professora Ida Cristina Gubert, pela valiosa colaboração no empréstimo de alguns equipamentos, além de seu incentivo e disposição.

À professora Ana e a seus estagiários Talita e Eduardo pela ajuda, apoio e paciência no início deste trabalho.

Ao Mauricio Passos, pelas correções, sugestões e empréstimo de materiais que tornou possível a realização de parte deste trabalho.

Ao professor Rodney, do Departamento de Zoologia – UFPR, pelo apoio e incentivo.

À funcionária do Departamento de Patologia Básica, Clotilde, pela colaboração constante.

À querida secretária da coordenação do curso de Ciências Biológicas Rosane Cavet Martins, pelos momentos de descontração, esclarecimentos de dúvidas, conselhos e amizade.

Ao Sidival Ruppel fotógrafo do Setor de Ciências Biológicas pelas fotos que enriqueceram este trabalho.

Aos amigos de curso em especial Letizia, Roxana, Giovana, Eduardo, José, Catiane, André, Renata, pelo incentivo, amizade e conselhos.

A todos os amigos da faculdade ou não, que me ajudaram a vencer obstáculos e aprender as lições da vida.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTAS	vii
RESUMO	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Morfologia básica dos insetos	3
2.2 Características gerais dos fungos.....	3
2.2.1 Fungos endofíticos	4
2.2.2 Fungos endofíticos entomopatogênicos	4
2.3 O gênero <i>Paecilomyces</i> sp.....	5
2.4 Processo de infecção	5
2.5 Produção de enzimas	7
2.5.1 Proteases	9
2.5.2 Lipases	13
2.5.3 Quitinases.....	15
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Linhagem do fungo <i>Paecilomyces</i> sp.....	19
4.2 Meios de culturas	19
4.2.1 Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA)	19
4.2.2 Meio de cultura para visualização da quitinase.....	19
4.2.3 Meio de cultura para visualização da protease	21
4.2.4 Meio de cultura para visualização da lipase	21
4.3 Soluções.....	22
4.3.1 “Tween 80” 0,1M.....	22
4.3.2 Tampão Fosfato 50mM (pH 8,0).....	22
4.4 Reagentes	23
4.4.1 Trietanolamina	23
4.5 Inoculação	23
4.6 Temperatura e pH dos meios	23
4.7 Esterilização dos meios de cultura e equipamentos.....	23

4.8 Métodos para a determinação da atividade enzimática	23
4.8.1 Obtenção do extrato enzimático	23
4.8.2 Atividade enzimática da lipase.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Produção das enzimas.....	25
5.1.1 Atividade da quitinase	27
5.1.2 Atividade da lipase	27
5.1.3 Atividade da protease.....	32
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTAS

1. TABELAS

Tabela 1- Fluxograma da extração de quitina sem tratamento.....	20
Tabela 2- Fluxograma da extração de quitina com tratamento.....	20
Tabela 3- Produção de enzimas pelo fungo endofítico <i>Paecilomyces</i> sp.....	25
Tabela 4- Atividade enzimática da lipase em U/mL.	29

2. FIGURAS

Figura 1- Formação de halo da enzima lipase	25
Figura 2- Formação de halo da enzima protease	26

RESUMO

Neste trabalho foram analisadas as produções das enzimas quitinases, lipases e proteases, e a quantificação ou atividade enzimática de uma delas, a lipase, do fungo endofítico entomopatogênico *Paecilomyces* sp. isolado da soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Foram utilizados substratos específicos para cada enzima, para quitina cascas de camarão, para lipase tributirina, para protease gelatina e caseína, sendo desta maneira confirmada a produção enzimática das três enzimas. A quantificação da enzima lipase teve como resultado 0,0295U/mL, devendo ser repetida para uma real avaliação da atividade enzimática por parte do fungo endofítico *Paecilomyces* sp.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o controle microbiano de pragas teve grande desenvolvimento nos últimos vinte anos, onde mais de 1400 artigos científicos envolvendo os principais grupos de entomopatógenos foram publicados, e dezenas de projetos nessa área são conduzidos nas universidades e centros de pesquisa. Algumas pragas importantes, como a lagarta-da-soja, cigarrinhas, cupins, broca-dos-citros, pernilongos, borrachudos, etc., vêm sendo controladas eficientemente com inseticidas microbianos, o que tem contribuído para a economia de divisas e redução da poluição ambiental. Também pode se afirmar que, para a maioria das pragas importantes, existe um patógeno capaz de regular sua população, o que demonstra o grande potencial do controle microbiano (ALVES, 1998).

Atualmente são encontrados no mercado mundial quase duas centenas de bioinseticidas, os quais conseguem gerar um faturamento aproximado de 300 milhões de dólares, o que representa muito pouco em função do potencial desses entomopatógenos e do faturamento total com produtos fitossanitários, que supera a cifra de 30 bilhões de dólares (ALVES, 1998).

Somente o mercado brasileiro poderia ser responsável por um elevado faturamento, se as indústrias investissem mais no desenvolvimento dos inseticidas microbianos, os quais, pela praticidade do uso, eficiência no controle e segurança ao ambiente, serão sucessores biológicos mais adequados aos produtos químicos atualmente utilizados no controle de pragas e vetores de doenças (ALVES, 1998).

Apesar de os defensivos agrícolas terem uma alta e rápida eficiência, são necessárias aplicações repetidas desses produtos, o que representa grandes quantidades lançadas no ambiente e um alto custo. Esses produtos químicos propiciam uma alta produtividade, mas têm efeitos negativos sobre o solo, o clima, a vegetação, as águas, os animais e o homem, e provocam a seleção de mutantes resistentes, resultantes da forte pressão seletiva. Além disso, seu tempo de degradação no ambiente é da ordem de décadas, o que provoca uma concentração elevada dessas substâncias na cadeia alimentar.

Nesse contexto, o controle biológico é uma alternativa viável para o combate de pragas e patógenos e vantajosa em relação ao controle químico, especialmente quanto ao impacto ambiental, ao custo, à especificidade e ao desenvolvimento de resistência.

Entre os microrganismos patogênicos com aplicação potencial em controle biológico destacam-se os fungos filamentosos. Quando comparados a outros sistemas utilizados em controle biológico, como bactérias produtoras de toxinas, protozoários e vírus, os fungos apresentam como vantagem um mecanismo especializado de infecção, que ocorre pela sua penetração ativa nos hospedeiros, não dependendo, assim, da sua ingestão para que se inicie o processo de infecção.

O maior entrave para a utilização de fungos filamentosos no controle biológico é o grande lapso de tempo entre sua aplicação e a morte dos hospedeiros, se comparados com os pesticidas químicos. Durante esse período de tempo, as pragas agrícolas podem causar sérias perdas na produtividade da cultura-alvo. Um dos objetivos comuns no estudo desses microrganismos em controle biológico visa a aumentar a velocidade de morte dos hospedeiros para melhorar a eficiência do biocontrolador. Têm sido feitos esforços no intuito de melhorar a produção, a estabilidade e aplicação de inóculos desses fungos. O entendimento das características básicas da relação entre o fungo e o inseto hospedeiro tem permitido conhecer a natureza da patogenicidade, com vistas a acelerar o processo de infecção e de diminuir, assim, o tempo entre o início da infecção e a morte do hospedeiro (ST. LEGER et al., 1996).

Este trabalho tem por objetivo testar o potencial entomopatogênico do fungo endofítico *Paecilomyces* sp. isolado de soja (*Glycine max* L. *Merriell*), observando e quantificando a produção de enzimas extracelulares responsáveis pela penetração do patógeno no inseto alvo. Os dados obtidos no presente projeto serão de grande valia para futuros esforços na obtenção de um bioinseticida a base do fungo endofítico *Paecilomyces* sp..

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Morfologia básica do inseto

O corpo de um inseto corresponde a uma sucessão de segmentos ao longo do eixo principal do corpo.

Parede do corpo ou tegumento:

O tegumento dos insetos se apresenta geralmente como uma carapaça mais ou menos dura e rígida, às vezes flexível e elástica, brilhante ou opaca, colorida ou não. O tegumento apresenta várias funções, as quais são detalhadas a seguir:

- Proteção contra influências externas: umidade excessiva, evita o ressecamento do corpo, impedindo a transpiração e desidratação.
- Evita a penetração de microrganismos patogênicos, parasitas e inseticidas.
- Serve para a fixação dos músculos e suporte para alguns órgãos.

O tegumento dos insetos é constituído por três camadas: cutícula, mais externa; epiderme e membrana basal.

Cutícula: É uma camada formada por material secretado pelas células da epiderme e depositado na superfície externa dos insetos. É formada por duas camadas mais ou menos distintas: a epicutícula e a procutícula. A epicutícula não possui quitina é formada por uma camada de cera, sua função é de impermeabilizar a cutícula. A procutícula é formada por quitina, proteínas e pigmentos. A quitina é o constituinte mais abundante da cutícula.

A percentagem de quitina no tegumento varia entre os diferentes insetos, nas diversas partes do corpo e nos diversos estágios de desenvolvimento. Larvas têm maior percentagem de quitina que os adultos. No tegumento geral a percentagem de quitina é em média 35%. (BUZZI e MIYAZAKI, 1999).

2.2 Características gerais dos fungos

Os fungos são organismos de tamanho e forma variáveis. Podem ser unicelulares, como no caso das leveduras, ou constituídos por um conjunto

filamentoso de micélio, por sua vez composto de células denominadas hifas, com parede constituída quimicamente de quitina e/ou celulose, além de outros açúcares. As hifas podem ter um ou mais núcleos, contidos na mesma célula hifal, ou apresentar os núcleos em uma massa citoplasmática contínua sem os septos transversais (micélio cenocítico) (ALVES, 1998).

2.2.1 Fungos endofíticos

Uma variante do controle biológico é a utilização de microorganismos endofíticos. Microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior de plantas, geralmente suas partes aéreas, folhas, ramos e caule, sem causar, aparentemente, qualquer dano ao seu hospedeiro (AZEVEDO, 1998).

Todos os microrganismos que habitam, pelo menos durante um período de seu ciclo vital, o interior de um vegetal podem ser considerados endofíticos (FOKKEMA e VAN DEN HEUVEL, 1986; ISAAC, 1992; REDLIN e CARRIS, 1996 e AZEVEDO, 1998).

Principalmente a partir dos anos 70, estes organismos, até então considerados neutros, ou seja, não causavam benefícios nem tampouco prejuízos às plantas, passaram a ser melhor estudados e concluiu-se que, em vários casos analisados, desempenham importante papel na proteção do hospedeiro contra o ataque de predadores e patógenos (AZEVEDO, 1998).

2.2.2 Fungos endofíticos entomopatogênicos

Fungos entomopatogênicos bastante conhecidos e já largamente empregados no controle biológico de insetos pragas da agricultura são encontrados como endófitos. Esse é o caso de *Beauveria bassiana*, encontrado como endófito no milho protegendo o hospedeiro contra o ataque de insetos (BING e LEWIS, 1993).

Esses agentes foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados no controle microbiano. Os fungos entomopatogênicos diferenciados, como aqueles com capacidade de colonizar e provocar a morte de insetos, constituem um grupo de microrganismos amplamente estudados em todo o mundo, tendo sido identificadas, até o presente momento, mais de 700

espécies, reunidas em 100 gêneros. A maioria dos fungos entomopatogênicos pertencem à classe dos deuteromicetos. Estes fungos têm a particularidade de parasitar diferentes tipos de artrópodos, insetos e ácaros, serem encontrados em habitats dos mais variados, desde o aquático ao terrestre, e colonizarem artrópodos que afetam culturas anuais, semipermanentes e permanentes (ALVES, 1998).

2.3 O gênero *Paecilomyces* sp.

O *Paecilomyces* sp. é um eucarioto pertencente a classe dos Deuteromicetos.

O gênero *Paecilomyces* sp., por reunir diversas espécies entomopatogênicas, tem um papel chave na hidrólise da cutícula de insetos, sendo desta maneira, muito utilizado como agente de biocontrole. Os conidióforos de *Paecilomyces* são simples ou em sinema, verticilados e sustentando fiálides com pescoço. Os conídios podem ser elípticos unicelulares, hialinos ou fracamente pigmentados, e as colônias, dependendo da espécie e meio, têm coloração geral branca, amarela, rosa ou avermelhada (ALVES, 1998).

Uma espécie de *Paecilomyces* tem sido observada provocando epizootias sobre a população de lagartas de um dalcerídeo, praga de eucalipto no Espírito Santo. (ALVES, 1998).

O gênero *Paecilomyces* sp., o qual está amplamente distribuído na natureza, reúne diversas espécies entomopatogênicas, sendo as mais freqüentes *P. farinosus*, *P. tenuipes*, *P. amoeneroseus*, *P. cicadidae*, *P. fumosoroseus*, etc. (ALVES, 1998).

2.4 Processo de infecção

Um dos processos de infecção mais conhecidos é do fungo *M. anisopliae* que em seus hospedeiros ocorre em fases sucessivas de germinação, diferenciação, penetração, reprodução e disseminação (SCHRANK et al., 1993; ALVES, 1998).

O processo de infecção é iniciado pela germinação dos esporos sobre a cutícula do hospedeiro. Na superfície do esporo, ainda não germinado, foi detectada a presença de enzimas (proteases, esterases e N-acetilglicosidases) que têm efeito na adesão, na aquisição preliminar de nutrientes e que também causam modificações superficiais nas camadas mais externas da cutícula do hospedeiro (ST. LEGER et al., 1990). O esporo germina e o tubo germinativo se diferencia por dilatação da extremidade das hifas para a formação do apressório, uma estrutura especializada de penetração, estimulada pelo contato físico com a cutícula do hospedeiro (ST. LEGER et al., 1991b). Esse estímulo também é sensível a alterações da superfície, indicando um possível mecanismo pelo qual o patógeno reconhece seu hospedeiro (ST. LEGER et al., 1990).

Após a formação do apressório, ocorre o desenvolvimento de estruturas denominadas grampos de penetração, que são caracterizadas por uma alteração na parede celular da parte do apressório que está em contato com o hospedeiro, sendo mais fina e saliente (ST. LEGER et al., 1991b). Evidências obtidas por microscopia eletrônica e histoquímica sugerem que a etapa de penetração ocorre por uma combinação de degradação enzimática e pressão mecânica (ST. LEGER et al., 1988). Nesse processo são produzidas algumas enzimas como lipases, quitinases e proteases (ST. LEGER et al., 1986, 1988, 1991; PINTO et al., 1996; ALVES, 1998).

Após o processo de penetração, o fungo inicia a etapa de colonização do hospedeiro. As hifas que atravessam a cutícula do hospedeiro sofrem um engrossamento e se ramificam inicialmente no tegumento e, posteriormente, na cavidade geral do corpo, liberando toxinas e ocasionando a morte do hospedeiro devido à produção de metabólitos secundários denominados destruxinas, que afetam os canais de transporte de íons, envolvidos na resposta muscular e a integridade da membrana celular. O hospedeiro exibe vários sintomas incluindo inquietação, perda de coordenação e parada da ingestão de alimento (LAVERLAM, 1999).

Após a morte do hospedeiro, que ocorre de 4 a 5 dias após a infecção, as hifas se desenvolvem invadindo os diversos órgãos internos. Após o esgotamento dos nutrientes, as hifas se estendem para fora do corpo do hospedeiro, formando um micélio, que cobre a superfície do tegumento,

resultando na mumificação. Sob condições ambientais apropriadas, ocorre a produção de esporos, que poderão ser disseminados pelo vento para infectar outros indivíduos (LAVERLAM, 1999).

2.5 Produção de Enzimas

As enzimas são os produtos microbianos mais explorados na indústria biotecnológica, depois da produção de antibióticos, sendo utilizadas amplamente no processamento de alimentos, produção de detergentes biológicos, indústria têxtil e farmacêutica.

Os fungos ao contrário das bactérias, vírus e protozoários, não necessitam ser ingeridos pelo hospedeiro para causarem infecção, bastando para isso, que seus esporos penetrem diretamente através da cutícula dos insetos. Este processo pode ser aumentado pela produção de enzimas que degradam a cutícula (ALVES, 1998).

Muitos pesquisadores encontraram uma relação entre patogenicidade e produção de enzimas extracelulares (BIDOCHKA e KHACHATOURIANS, 1994; CLARKSON e CHANRLEY, 1996).

Vários fungos produzem enzimas, as quais supostamente facilitam a penetração através da cutícula de insetos e a invasão subsequente do seu corpo. Uma vez que a cutícula do inseto é composta por proteínas, quitinas e lipídios, as pesquisas têm se concentrado nas atividades proteolíticas, lipolíticas e quitinolíticas, bem como na função dessas enzimas como um mecanismo possível, pelo qual os fungos entomopatogênicos podem transpor a cutícula do hospedeiro. Essas enzimas, possivelmente presentes nas hifas penetrantes, consistem de proteases, lipases e quitinases (MELO e AZEVEDO, 2000).

As proteases, além de estarem envolvidas nos processos de formação e germinação dos esporos, têm funções nutricionais importantes, sendo capazes de hidrolisar as cadeias polipeptídicas em moléculas menores, que são absorvidas pelas células. Do outro lado, as lipases são responsáveis pelo fracionamento dos lipídios (óleos e gorduras) existentes na superfície dos insetos, para posterior metabolização pelos microrganismos. As quitinases, por sua vez, promovem a hidrólise da quitina dos insetos, a qual é feita por um

sistema quitinolítico que envolve duas hidrolases (quitinase e quitobiase) que atuam seqüencialmente (ALVES, 1998). Tem sido evidenciado que a quitinase tem um papel menor na penetração da cutícula, quando comparada com proteases, mas pode exercer uma função importante, dependendo da estrutura cuticular do inseto (CHARNLEY e LEGER, 1991).

Um exemplo de iniciação de processo infeccioso, em fungos como *Beauveria bassiana*, começa com aderência de conídios à cutícula de um hospedeiro suscetível, através de mecanismos hidrofóbicos/enzimáticos (BOUCIAS, PENDLAND e LATGE, 1988). A habilidade dos conídios de fungos entomopatogênicos de se aderirem, germinarem e penetrarem ao tegumento cuticular, resultando em crescimento micelial e subseqüentemente morte da praga é um processo biológico curioso (SAYED et al. 1993). Acredita-se que as enzimas extracelulares produzidas por *Beauveria* desempenhem um papel chave na hidrólise da cutícula.

PARIS e SEGRETAİN (1978) relataram que a virulência de *Beauveria bassiana* estava relacionada à produção de lipase, o que facilitaria a seleção das raças com essa característica.

A incapacidade de produção da quitinase e lipase por *Beauveria brongniartii* pode estar correlacionada com a incapacidade desse patógeno de infectar *Melolontha melolontha* (PARIS e FERRON, 1979).

ROBINSON (1966) estudou o processo de penetração dos fungos *Aspergillus flavus*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces farinosus* e *Cordyceps militaris*, através do tegumento de *Tenebrio molitor*, comparando com outros fungos não patogênicos e que não penetram a exocutícula. O autor atribui a capacidade de produção de enzimas quitinolíticas ou proteolíticas à eficiência de penetração, embora estejam envolvidos no processo aspectos de ordem mecânica, como pressão de hifas exercidas mediante a ação dos apressórios.

Os mutantes virulentos de *Metarhizium anisopliae* estão correlacionados com altas produções de proteases (quimoelastases), as quais causam a lise das proteínas do tegumento, agilizando o processo de penetração do fungo (ST. LEGER et al., 1988).

Com relação à virulência de *N. rileyi* foi possível correlacionar altos índices de produção de quitinase com a elevada virulência de certos isolados, o que incorreu em um isolado não virulento (EL SAYED et al., 1989).

2.5.1 Proteases

O termo protease é usado amplamente para todas as enzimas que clivam ligações peptídicas. As proteases podem ser subdivididas em exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases atuam sobre ligações peptídicas amino ou carboxiterminal, ao passo que as endopeptidases clivam ligações peptídicas internas nos peptídeos. (KHAN e ROUFOGALIS, 1994).

Quatro classes distintas de proteinases são conhecidas: a) serinas proteinases – caracterizadas pela presença de resíduo de serina no seu centro ativo, o qual é o sítio de ligação do substrato; b) cisteínas proteinases – com um resíduo essencial de cisteína responsável pela ligação ao substrato; c) proteinases aspárticas – contendo um ou dois resíduos de aspárticos no seu centro ativo participando na catálise (proteinases que são ativas em pH ácidos); d) metaloproteinases – contendo íons metais, usualmente o zinco, em seu sítio ativo (são enzimas ativas em pH em torno da neutralidade). (NORTH, 1982; KHAN e ROUFOGALIS, 1994).

Nos fungos a maioria das proteases são extracelulares. Em algumas espécies somente um tipo foi detectado, em muitas outras espécies duas proteases ou até três foram encontradas, com a prevalência de aspártico e serinas proteases, expressas em condições diferentes de crescimento para cada tipo (NORTH, 1982).

Foi demonstrado que entre os genes expressados especificamente durante o processo de infecção de *M. anisopliae* no hospedeiro está o gene *pr 1A*, originalmente *pr 1*, que codifica uma protease do tipo subtilisina (PR1A), que tem uma participação marcante na penetração da cutícula do hospedeiro pelo fungo. ST. LEGER et al. (1992) demonstrou que a protease PR1A é mais efetiva na degradação estrutural das proteínas ligadas à cutícula por ligação covalente, devido aos resíduos de cargas positivas que se formam na superfície da molécula de PR1A em pH neutro ou alcalino.

O gene PR1A é altamente regulado e somente expressado durante a fase de penetração (ST. LEGER et al., 1992). Esse gene está sob controle duplo de expressão: i) pelo mecanismo de repressão catabólica regulado pelos níveis de carbono e nitrogênio (ST. LEGER., 1998b) e, ii) pela indução específica promovida pelas proteínas da cutícula (PATERSON et al., 1994). A protease PR1A hidrolisa de 25% a 30% das proteínas da cutícula dos hospedeiros liberando peptídeos que servirão de nutrientes para o fungo e substratos para a elaboração de outros determinantes da patogenicidade (ST. LEGER et al., 1986).

Foi observado por ST. LEGER (1987) um aumento da protease PR1A durante a penetração do fungo *M. anisopliae* na cutícula de larvas de *Manduca sexta*.

BOTTON et al (1985) cultivaram o fungo *Cenococcum geophilum* em meio completo tendo como fonte de nitrogênio a amônia. Após 8 dias de cultivo, com os níveis de atividade catalítica baixos, os micélios foram filtrados e transferidos para um meio de cultura fresco contendo proteínas (gelatina, BSA e caseína) como fonte de nitrogênio. As atividades enzimáticas, sob condições de indução, apareceram em 24 a 30 horas. A secreção de proteases continuou linearmente por até 10 dias. A gelatina foi melhor indutor do que o BSA e caseína.

SINGH (1994) estudando a produção de proteases ácidas (proteinases aspárticas) do gênero *Aspergillus* descreveu uma atividade proteolítica de *Aspergillus niger* com pH ótimo de 4,0. Esta protease ácida tem sua atividade máxima a 60°C, conservando 60% da atividade a 80°C. A protease ácida de *Penicillium expansum* foi estável somente a 45°C, entretanto as enzimas de *Aspergillus oryzae* e as de *Aspergillus claudii* perderam suas atividades em temperaturas superiores a 40°C. Foi determinado o pH ótimo para a atividade proteolítica ácida dos seguintes fungos: *Aspergillus saitoi* 3,0 a 4,5, *Aspergillus oryzae* 3,0 a 4,0, *Paecilomyces varioti* 3,5 a 5,5, *Mucor pusillus* 3,5 a 4,5 (FARLEY e IKASARI, 1992).

A atividade de protease, quando *Aspergillus oryzae* foi cultivado em meio líquido contendo 1% de glucose, apareceu após vários dias de crescimento e quando o organismo havia atingido a fase estacionária de crescimento. Observou-se que a idade celular não foi o fator para a produção

da enzima. Assim, quando as células jovens foram transferidas para um meio de cultivo que já havia servido como substrato para crescimento do fungo por 6 dias, a enzima foi imediatamente detectada no meio de cultivo, sugerindo que a composição do meio, o qual presumivelmente foi alterado em função do crescimento, seja o maior fator na regulação do aparecimento extracelular da enzima. Os níveis de protease aumentaram somente depois que a concentração de glucose havia sido depletada. Isto demonstra que a concentração da fonte de carbono foi um fator importante na regulação do aparecimento da enzima no meio de cultivo (KLAPPER et al., 1973).

Para MARZLUF (1981) embora certos compostos, particularmente a amônia, glutamato e glutamina sejam fontes favoráveis de nitrogênio, os fungos são capazes de utilizar diversas fontes secundárias, incluindo nitrato, nitrito, purinas e proteínas. O uso destas fontes de nitrogênio secundárias invariavelmente requerem a síntese de enzimas catabólicas ou em alguns casos a ativação de enzimas previamente existentes.

Segundo BIDOCHKA e KHACHATOURIANS (1988), a síntese de protease pode estar reprimida se a glucose, amônia e o enxofre estiverem presentes, e serão sintetizadas e liberadas quando o meio de cultivo estiver deficiente em alguns destes componentes.

Para NORTH (1982), os níveis de proteinases dos fungos respondem às mudanças em nutrientes do meio, e têm sido notadas a indução e “desrepressão” de proteinases extracelulares. A produção de enzimas extracelulares ocorre sob condições de limitações de nitrogênio, carbono e enxofre.

O crescimento e a autólise de duas linhagens de fungos deuteromicetos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* isolada por BRAGA et al. (1999) foi estudada em meio contendo caseína ou glicose como fonte de carbono e parâmetros como coeficiente de rendimento e grau de autólise, foram determinados para cada linhagem. A produção de protease foi determinada ao longo das fases de crescimento e autólise das culturas em meio sob condições de indução da protease na presença de caseína como única fonte de carbono e nitrogênio). O fungo mostrou uma melhor capacidade de utilizar caseína como fonte de carbono/energia do que a glicose. A autólise mostrou-se intensa para as linhagens em ambas as condições de crescimento,

resultando em 62,7% de massa seca produzida e iniciada tão logo exauriu-se a fonte de carbono interna. A relação entre a atividade proteolítica das duas linhagens avaliadas, variou significativamente (um máximo de 19,78 no 5º dia e um mínimo de 2,03 no 16º dia de crescimento) durante as várias fases de crescimento e autólise, mostrando claramente que as diferenças entre as curvas de crescimento e que a diferença entre a cinética da produção de enzimas pode afetar decisivamente o processo de seleção da linhagem para a produção de protease.

SPACKI et al.(2001) realizaram um trabalho sobre análise da produção de proteases e compatibilidade a produtos fitossanitários apresentados pelos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. O objetivo era analisar a produção de protease extracelular dos dois fungos, além da avaliação “in vitro” da compatibilidade de alguns defensivos agrícolas com estes isolados. Os isolados foram incubados em meio definido (MM) contendo 1% dos diferentes substratos (caseína, gelatina, albumina e farinha de crisálida de *Bombyx mori*). Após 96h de incubação foi feita a revelação do halo de degradação pela adição de ácido tricloroacético (10%). A atividade enzimática foi determinada através do Índice de Relação Enzimática (I.R.E.). O experimento com produtos fitossanitários foi realizado em meio BDA acrescido com os produtos nas concentrações indicadas pelos fabricantes. Todos os isolados analisados apresentaram halo de degradação dos substratos (I.R.E.> 1,0). A maioria dos isolados apresenta valores de I.R.E. maiores para cutícula>gelatina>caseína>albumina, respectivamente.

O fungo entomopatogênico *Metarhizium flavoviride* tem sido descrito como uma das espécies mais promissoras para o controle de gafanhotos. (PINTO et al. , 2001). Fungos entomopatogênicos possuem vários fatores de virulência, incluindo a produção de enzimas, sendo as proteases consideradas fundamentais no processo de penetração através da cutícula do inseto. Neste trabalho foi analisada a produção de proteases extracelulares por isolados de *Metarhizium flavoviride* os quais tem sido usados como controladores de gafanhotos. Observou-se que um conjunto de proteases produzidas por estes fungos é de caráter neutro. A temperatura ótima para a detecção de atividade proteolítica foi de 28°C e o tempo de incubação da reação enzimática ultrapassa 120 minutos. A prevalência da ação dos inibidores proteolíticos

PMSF (fenilmetil-sulfonil-fluoreto) e TLCK (N-a-p-tosil-lisina-clorometil cetona) sobre as atividades enzimáticas, permitiu proteases do tipo serini-protease, tripsina e cisteíno protease.

2.5.2 Lipases

A definição clássica de lipase descreve estas enzimas como glicerol éster hidrolases, que atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol (JAEGER et al., 1994).

Embora lipases sejam muito difundidas na natureza, tanto na flora quanto na fauna, são mais abundantemente encontradas em microrganismos (bactérias, fungos e leveduras). Com o desenvolvimento da biotecnologia muita atenção tem sido dada ao uso de lipases de origem microbiana (PANDEY et al., 1999).

No caso de aplicações de novas enzimas em processos das indústrias de alimentos ou de medicamentos, por exemplo, o processo de licenciamento de uso de enzimas por microrganismos geneticamente modificados é longo e trabalhoso e muitas vezes, impossível de ser realizado dentro de um prazo economicamente viável. Mesmo reconhecendo-se que as técnicas de engenharia genética são importantes para a produção em larga escala de enzimas altamente ativas e estáveis, há que se começar por microrganismos que produzam estas enzimas originalmente, para então se tentar otimizar a sua expressão e otimização da produção (LIMA, 2000).

A literatura relata que várias espécies de fungos produzem enzimas lipolíticas. Entre os microrganismos, os fungos são particularmente interessantes, por que para a maioria deles, as lipases produzidas são extracelulares, facilitando sua recuperação do meio de cultivo por simples filtração ou centrifugação (FROST e MOSS, 1987).

A maioria das lipases fúngicas apresenta uma faixa ótima de atividade e estabilidade entre pH 6,0 e 8,0 e temperatura ótima para atividade máxima entre 30 e 40°C. Estas propriedades, entretanto, podem variar significativamente, dependendo da origem, ou mesmo entre isoformas produzidas por um mesmo organismo (FROST e MOSS, 1987).

A temperatura de incubação dos cultivos para a produção de lipases depende do microrganismo a ser cultivado, mas para os fungos de maneira geral, a temperatura ótima está entre 25 e 30°C. Variações de temperatura durante o cultivo parecem influenciar grandemente a produção da enzima (OHNISHI et al., 1984).

A seleção de cepas lipolíticas foi realizada por diversos autores em placa de Petri contendo ágar emulsificado com tributirina ou trioleína. Os testes com tributirina são geralmente avaliados através da formação de halos claros ao redor das colônias. Nos cultivos com trioleína observa-se a formação de um halo fluorescente ao U.V. devido à formação do complexo ácido graxo-rodamina B, corante adicionado ao meio de cultivo (JAEGER et al., 1999 ; THOMSON et al., 1999; JETTE e ZIOMEK, 1994; RAPP e BACKHAUS, 1992; SZTAJER e MALISZEWSKA, 1988).

Para acompanhar a atividade lipolítica no meio de fermentação há vários métodos disponíveis, sendo os mais citados o titulométrico, usando triacilgliceróis, principalmente trioleína, como substrato para a atividade enzimática e os espectrofotométricos, utilizando substratos sintéticos. O método titulométrico, embora seja pouco sensível, é o método oficial para a determinação de atividade lipolítica. Baseia-se na titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima com um volume de NaOH ou KOH. O volume de base utilizada, em função do tempo de reação, é relacionado com a quantidade de ácidos graxos liberados e conseqüentemente com a atividade enzimática. Neste método citam-se como substratos principalmente óleo de oliva, trioleína e tributirina, em meio emulsionado (KRIGER, 1995; STUER et al., 1986).

MORAES et al. (2001) fizeram análise da produção de lipase, protease e fosfolipase através de dois fungos *Aspergillus* e *Penicillium*. Para este trabalho foram utilizadas duas temperaturas de incubação 28°C e 37°C. Para a atividade lipolítica foi utilizado o meio "Sorbitan Monolaurate" acrescido de "Tween" 20. A atividade proteolítica foi detectada utilizando o meio ágar nutritivo, acrescido de 8% de gelatina. No gênero *Aspergillus* os melhores resultados foram obtidos na temperatura de crescimento de 37°C, sendo que 72% dos isolados apresentaram atividade proteolítica e 70% dos isolados a fosfolipásica. A atividade lipolítica foi detectada em percentuais similares nas duas temperaturas de incubação. 75% dos isolados de *Penicillium* produziram

protease a 28°C, entretanto a temperatura de 37°C foi mais adequada para a produção de fosfolipase e lipase, 75% e 69% respectivamente.

2.5.3 Quitinases

A quitina depois da celulase, é um dos polímeros mais abundantes na natureza (FLACH et al., 1992). É encontrada como constituinte do exoesqueleto de insetos e de crustáceos, em conchas de moluscos e é o maior componente da parede celular de fungos (CABIB, 1987). As quitinases são enzimas hidrolíticas com a propriedade de hidrolisar a quitina em oligômeros de N-acetilglicosamina (NAG), que assim podem ser absorvidos e metabolizados (GOODAY, 1990; GOODAY et al., 1992). Muitos organismos produzem quitinases, entre eles, bactérias, fungos, crustáceos, insetos e plantas superiores.

Em fungos, cuja parede celular é composta basicamente por polissacarídeos como quitina e glicanas (GOODAY et al., 1992), as enzimas quitinolíticas estão basicamente envolvidas no processo de crescimento e diferenciação. Os fungos filamentosos também possuem quitinases que atuam em diferentes processos fisiológicos, como dispersão de esporos, autólise e nutrição (DE LA CRUZ et al., 1992; STIRLING et al., 1979 citado na revista Biotecnologia Ciência & desenvolvimento, 2001).

As enzimas quitinolíticas provavelmente desempenham um papel importante na penetração de fungos filamentosos através da cutícula dos hospedeiros. Essas enzimas se encontram sob forte regulação no fungo *M. anisopliae*, onde o sistema quitinolítico é regulado por um mecanismo de indução-repressão, tendo a quitina como indutor tanto da síntese como da secreção de quitinases, e a glicose como repressor de sua síntese. A concentração de monômero NAG também regula a síntese e secreção das quitinases, sendo que, em baixas concentrações, age como indutor, enquanto em altas concentrações, apresenta papel de repressor (BARRETO, 1996; MOREIRA, 1998).

Até o momento, não foi confirmada a participação das quitinases na entomopatogenicidade de *M. anisopliae*. Apesar dos estudos bioquímicos e do conhecimento acumulado, pouco se sabe quanto aos tipos, a regulação, a

localização, as seqüências envolvidas em sua glicosilação, a secreção e a participação das quitinases nos processos fisiológicos.

SANDHU et al. (1999) trabalhando com a produção de quitinase por *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) e celulase por *Aspergillus niger* (Van Tieghem) observou que estas produções estão no seu grau máximo no sétimo dia de incubação. A elevada produção de protoplasto proveniente de micélios jovens de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* foi obtida quando encubada por 1-2 horas em uma mistura de quitinase+celulase+enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Rifai). A fusão do protoplasto de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* ocorreu dentro de 1 hora de incubação em 30% PEG (polietileno glicol).

BRAGA et al. (1998) fizeram uma estimativa dos parâmetros genéticos relacionados à produção de quitinase pelo fungo *Metarhizium anisopliae*, essa atividade quitinolítica e produção de massa seca foi determinada do filtrado de cultura proveniente de 17 diferentes linhagens de *Metarhizium anisopliae*, crescidos em meios líquidos contendo quitina como fonte única de carbono. Os objetivos foram estimar parâmetros, assim como variância genética entre linhagens, hereditariedade e ganhos esperados pela seleção, assim como correlações entre eles. A amplitude da variabilidade genotípica foi observada entre linhagens na atividade quitinolítica, permitindo a utilização dessa propriedade na seleção. A alta hereditariedade sugere que o progresso pode ser feito através da seleção fenotípica. O coeficiente de correlação genotípica entre a produção de massa seca e atividade quitinolítica detectada nos filtrados foi negativa ($r_G = -0,588$). Um dos isolados também foi investigado pela variação entre dois tratamentos em função do tempo de incubação da cultura. Os resultados mostraram um aumento na atividade enzimática acima do 8º (e último) dia, e uma diminuição na massa seca a partir do 4º dia.

SOUZA et al. (2001) trabalharam com endoquitinase produzida pelo fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides*. Estudos anteriores sugerem que a atividade quitinolítica esteja envolvida no mecanismo de antagonismo entre microrganismos no ambiente, podendo ser um fator importante no biocontrole. Dessa maneira os autores objetivaram neste trabalho a purificação e caracterização de uma endoquinase produzida por

Colletotrichum gloeosporioides. Este fungo foi inoculado em meio Czapeck-dox contendo quitina como única fonte de carbono, em pH 7,0 / 200rpm / 28°C durante 4 dias e o pH ótimo de atividade da enzima foi 7,0.

3. OBJETIVOS

- a) Analisar a produção extracelular “in vitro” das enzimas protease, quitinase e lipase do fungo endofítico entomopatogênico *Paecilomyces* sp.
- b) Analisar a atividade enzimática da enzima lipase.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagem do fungo *Paecilomyces* sp.

Os isolados de *Paecilomyces* sp. utilizados neste estudo foram obtidos de folhas de soja do campo aos 20 dias de desenvolvimento da planta na Fazenda Experimental do Cangüiri da Universidade Federal do Paraná. (PIMENTEL, 2001)

Culturas puras foram mantidas em meio Batata-dextrose-ágar (BDA) (item 4.2.1). O inóculo foi preparado através da suspensão de esporos. Essa suspensão foi colocada em uma solução de "Tween 80" 0,1M e agitada em Vórtex durante alguns segundos, em seguida, algumas gotas eram despejadas na placa contendo BDA e espalhadas com auxílio da alça de Drigalsky.

4.2 Meios de Cultura

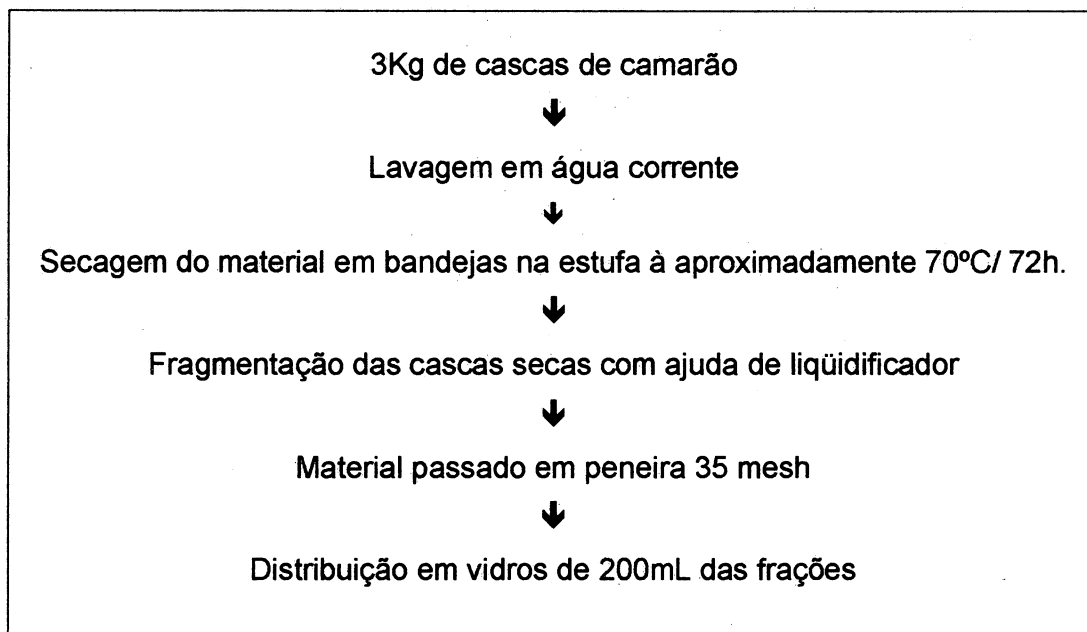
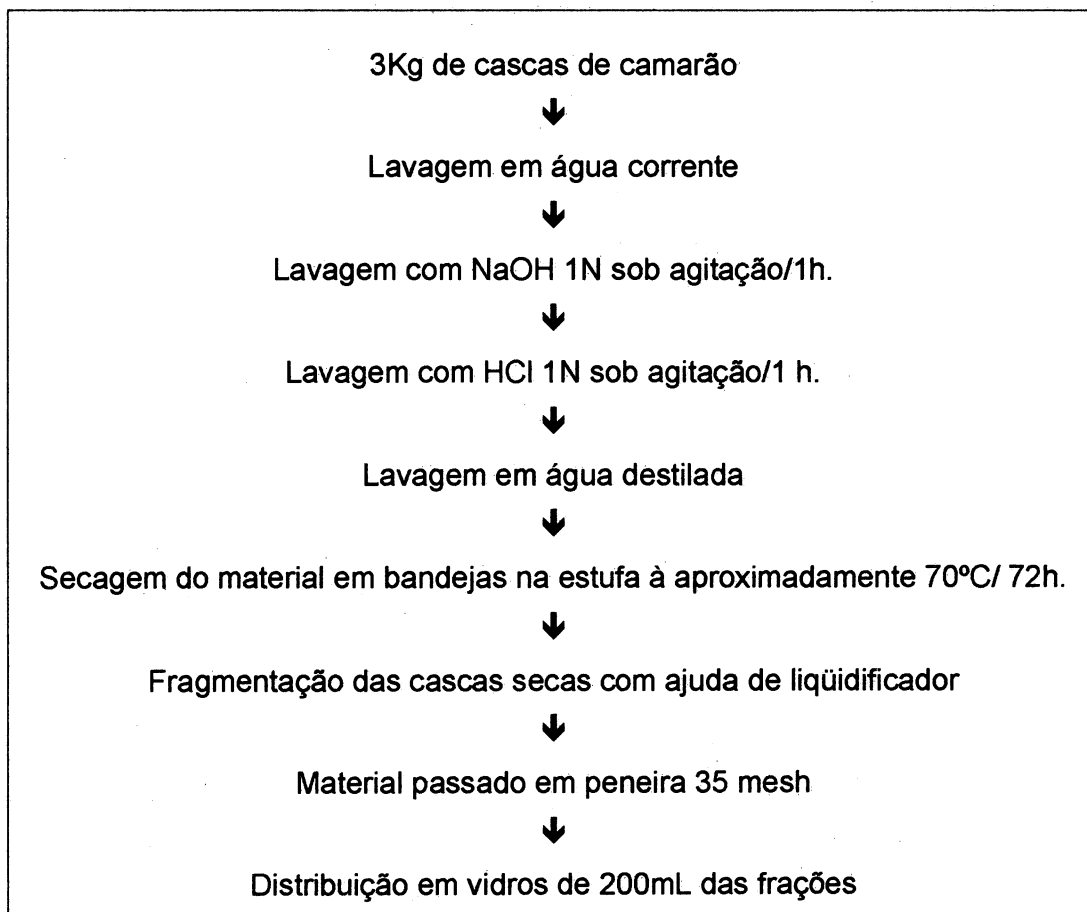
4.2.1 Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

Batata	200,0g
Dextrose	20,0g
Ágar	15,0g
Água destilada	p/1000mL

As batatas foram cortadas em pedaços pequenos e cozidas em 1 litro de água destilada por uma hora. Após filtração, o caldo resultante foi completado para 1000 mL. O meio foi autoclavado à 121°C a 1 atm por 20 minutos.

4.2.2 Meio de cultura para visualização da quitinase (CRUZ, 1985).

Procedimento de extração de quitina Tabelas 1 e 2 (FLUXOGRAMA).

TABELA 1- FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO DE QUITINA SEM TRATAMENTO.**TABELA 2-FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO DE QUITINA COM TRATAMENTO "PURIFICADA"**

1% de quitina (1g) em forma coloidal foi adicionada ao meio básico (BDA) (item 4.2.1), para a preparação de 100 mL de meio.

Leitura: A função enzimática foi observada após 7 a 10 dias de incubação (estufa aproximadamente a 28°C) pela formação de halo em torno da colônia.

4.2.3 Meio de Cultura para visualização da protease (CRUZ, 1985)

Para protease foram utilizados dois substratos protéicos diferentes, gelatina e caseína.

Gelatina ou caseína	15 g
Extrato de Carne	0,3 g
Peptona	0,5 g
Água destilada	100 ml
Ágar	2 g para caseína 3,5g para gelatina

Procedimento

O meio foi esterilizado por tindalização, para não haver desnaturação das proteínas fundido e distribuído nas placas.

Leitura: A função enzimática foi observada após 7 a 10 dias de incubação (estufa aproximadamente a 28°C) pela formação de halo em torno da colônia.

4.2.4 Meio de cultura para visualização da lipase (CRUZ,1985)

Sendo insolúveis em água, houve a necessidade de se fazer uma emulsão do lipídio. A emulsão e o meio foram preparados separadamente.

Preparo da emulsão:

Tributirina	0,1 mL
Ágar	2 g
Água destilada	10 mL

Preparo do meio:

Peptona	0,5 g
Extrato de carne	0,3 g
Água destilada	90 mL

Procedimento

A emulsão foi misturada, esterilizada a 121°C 1atm., resfriada a 50°C e agitada vigorosamente.

O meio foi esterilizado a 121°C a 1atm., resfriado a aproximadamente 50°C e acrescentado 10 ml da emulsão. Foi agitado e distribuído em placas de Petri com 90mm de diâmetro.

Leitura: A função enzimática foi observada após 7 a 10 dias de incubação (estufa aproximadamente a 28°C) pela formação de halo em torno da colônia.

4.3 Soluções**4.3.1 Solução "Tween" 80 (0,1% - v/v)**

"Tween" 80	0,1mL
Água destilada	99,9 mL

A solução foi distribuída em tubos de ensaio (2,5 mL por tubo), autoclavada e conservada no refrigerador a 4°C.

4.3.2 Solução tampão fosfato 50mM, pH 8,0

4.4 Reagentes

4.4.1 Trietanolamina

4.5 Inoculação

A inoculação foi feita através de um disco de 0,8mm. retirado dos meios inoculados com o fungo. Esse inóculo foi então transferido para os meios de quitinase (item 4.2.2), protease (item 4.2.3) e lipase (item 4.2.4).

4.6 Temperatura e pH dos Meios

A temperatura de incubação utilizada foi de aproximadamente 28°C. O pH foi ajustado de 5,0 a 7,5.

4.7 Esterilização dos Meios de cultura e Equipamentos

Para garantir condições de crescimento do fungo, os meios de cultura, bem como todos os materiais utilizados, foram esterilizados em autoclave a 121°C a 1atm. durante 20-30 minutos. O plaqueamento dos meios de cultura foi realizado em fluxo laminar.

4.8 Métodos para a determinação da atividade enzimática

4.8.1 Obtenção do extrato enzimático (THIVEND et al., 1965).

O extrato enzimático foi obtido através de centrifugação a 6000 rpm. durante 15 minutos.

4.8.2 Atividade enzimática da Lipase (LIMA, 2000)

A atividade lipolítica foi ensaiada pelo método titulométrico (STUER et al., 1986 modificado por LIMA, 2000), o qual baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima lipase sobre trigliceróis presentes no óleo de oliva.

Preparou-se uma emulsão com 20% (m/v) de óleo de oliva, 6% (m/v) de trietanolamina e 74% (v/v) de tampão fosfato 50 mM (pH 8,0), mantendo-se sob agitação constante de 180rpm por 30 minutos. A 5 ml da emulsão adiciona-se 0,5 mL de água destilada e mantém-se a aproximadamente 37°C por 10 minutos. A seguir, a solução assim preparada é incubada com 0,5 mL do extrato enzimático por 20 minutos a aproximadamente 37°C. Decorrido o tempo de incubação, adiciona-se 16 mL de solução de etanol-acetona 1:1 (v/v) e titula-se com NaOH 50mM. A atividade enzimática (U/ml) foi calculada de acordo com a fórmula:

$$U/mL = \Delta V / (20 \cdot 50 \cdot 2 \cdot fc)$$

Onde: ΔV = volume de NaOH gasto na titulação, 20 = tempo da reação em minutos, 50 = concentração de NaOH (mM), 2 = correção de volume de amostra de 0,5mL para 1,0mL, fc = fator da solução de NaOH.

Uma unidade enzimática (U.E.) foi definida como a concentração de enzima capaz de liberar 1 (μ mol de ácido graxo) / min \cdot (mL de solução enzimática).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção das enzimas

Os resultados para produção de enzimas quitinolíticas, proteolítica e lipolíticas pelo fungo endofítico *Paecilomyces* sp. isolado de soja estão apresentados na Tabela 3 e Figuras 1 e 2.

TABELA 3 – PRODUÇÃO DE ENZIMAS PELO FUNGO ENDOFÍTICO *Paecilomyces* sp

Enzima	halo
Protease	presente
Quitinase	presente
Lipase	presente

FIGURA 1- PRODUÇÃO DA ENZIMA LIPASE PELO FUNGO ENDOFÍTICO *Paecilomyces* sp. COM 8 DIAS DE INCUBAÇÃO EVIDENCIADA PELA FORMAÇÃO DE HALO AO REDOR DA COLÔNIA.

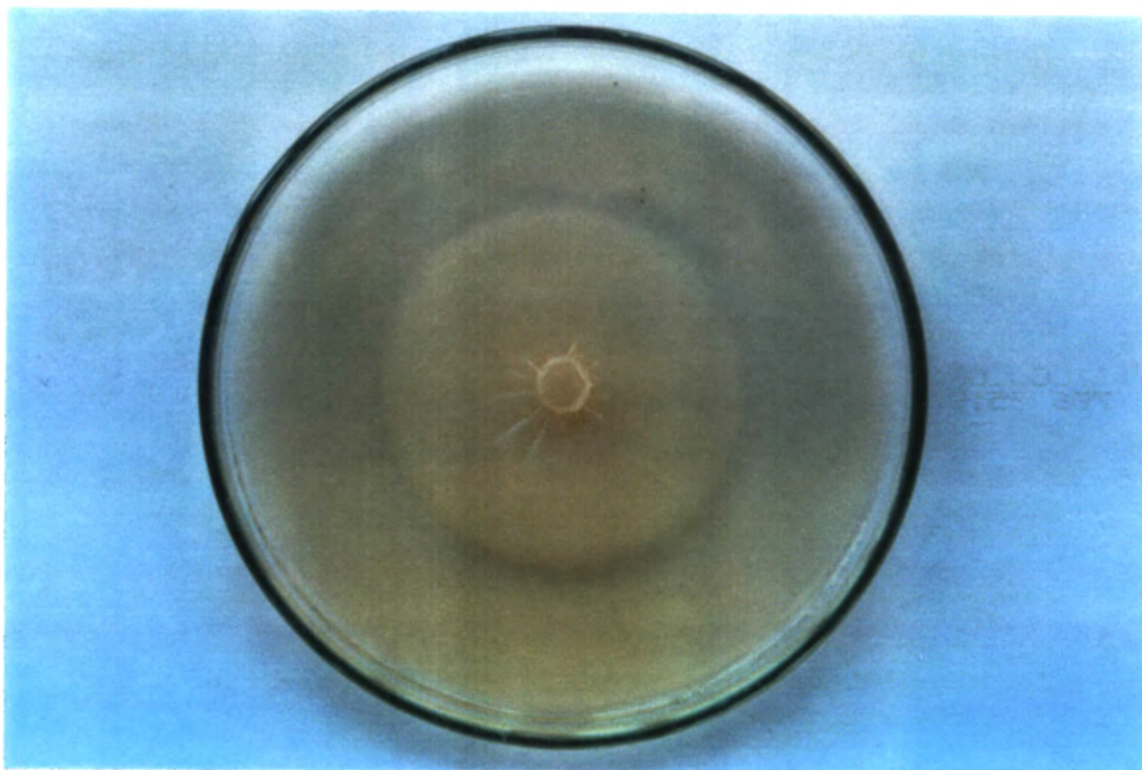


FIGURA 2- PRODUÇÃO DA ENZIMA PROTEASE PELO FUNGO ENDOFÍTICO *Paecilomyces* sp. COM 8 DIAS DE INCUBAÇÃO EVIDENCIADA PELA FORMAÇÃO DE HALO AO REDOR DA COLÔNIA.



Com o repique do fungo em ágar contendo como substratos principais: Tributirina (lipase), quitina (quitinase), gelatina e caseína (protease), houve produção das enzimas lipase, quitinase e protease evidenciadas pela presença de halos formados ao redor das colônias em um período de incubação que variou de 7 a 10 dias.

Embora diversos trabalhos relatem comparações quantitativas de atividades baseadas nos tamanhos dos halos produzidos nos métodos de placas de ágar, a literatura recomenda que estes métodos sejam utilizados somente para detecção qualitativa da enzima e não para comparar quantitativamente as atividades das enzimas produzidas (SHELLEY et al., 1987 citado por LIMA, 2000). Desta maneira, os resultados obtidos neste trabalho foram avaliados apenas pela presença ou ausência de formação de halo, pois houve crescimento irregular dos fungos, tornando inviável a sua quantificação por medida do diâmetro do halo.

5.1.1 Atividade da quitinase

Para detecção da atividade enzimática quitinolítica do fungo endofítico *Paecilomyces* sp. foram utilizados dois tipos de substratos principais; quitina sem tratamento (Tabela 1 item 4.2.2) e quitina com tratamento “purificada” (Tabela 2 item 4.2.2).

O primeiro objetivo deste trabalho foi analisar a produção de enzimas pelo fungo endofítico *Paecilomyces* sp. Foram feitos estudos preliminares para detecção da enzima quitinase e esta confirmou-se através da formação de halo ao redor da colônia. Nesses estudos preliminares tanto a quitina sem tratamento quanto a quitina com tratamento revelaram halos após 96h. de incubação.

Foram feitas quatro repetições para cada substrato, quatro para quitina sem tratamento e quatro para quitina com tratamento. Os halos formados nas oito placas não diferenciavam quanto ao tamanho para os dois tipos de substratos. É claro que faz-se necessária uma quantificação enzimática para cada substrato, quitina purificada e não purificada, para que se possa obter o real resultado quanto a produção da enzima quitinase.

O segundo objetivo do trabalho foi a quantificação da produção de quitinase, porém não foi conseguida a reprodutibilidade dos dados em relação a formação de halo em meio de quitina, o que impossibilitou a sua quantificação.

Ainda assim, foram realizadas mudanças em alguns fatores físicos que poderiam estar influenciando na produção da quitina como por exemplo o pH. Para isso foram testados meios de cultura com pHs 5,0; 6,0 e 7,5 mas não houve formação de halo.

Em virtude destes resultados sugere-se que o experimento seja repetido testando-se diferentes pHs, meios de cultura, bem como a utilização de quitina comercial.

5.1.2 Atividade da lipase

Detecção e Quantificação da atividade enzimática.

As lipases podem ser definidas como hidrolases, cujo substrato preferencial são os ácidos graxos de cadeia longa, e também como qualquer esterase capaz de hidrolisar ésteres de ácido oléico (BROCKMAN, 1984). Esta definição entretanto, tem se revelado muito restrita, porque estas enzimas têm capacidade de hidrolisar uma variedade de ácidos carboxílicos e não somente os acilgliceróis (MALCATA et al., 1992). As lipases são ativadas pela presença de interfaces promovidas pela formação de emulsões aquosas com substratos de cadeia longa, e a catálise ocorre preferencialmente na interface lipídeo/óleo (EGLFF et al., 1995; JAEGER et al., 1994; MARTINELLE e HULT, 1994; VERGER, 1980; VERGER e DE HAAS, 1976).

Neste trabalho, o substrato utilizado foi a tributirina, para demonstrar que a enzima produzida pelo fungo endofítico *Paecilomyces* sp. pode ser uma lipase “verdadeira”.

A escolha do substrato tributirina foi baseado no estudo de LIMA (2000) que trabalhou com a produção da enzima lipase pelo fungo *P. aurantiogriseum*. LIMA (2000) empregou como substrato para seu trabalho pNPP, um substrato sintético para a atividade de lipases. Este substrato pNPP já foi questionado por diversos autores porque não seria um substrato específico para lipases, podendo ser hidrolisado por esterases. Para provar que a enzima produzida por seu fungo *P. aurantiogriseum* era uma lipase “verdadeira”, LIMA utilizou ensaios com triacilgliceróis, usando como substratos principais a tributirina e trioleína, e deste modo confirmou que se tratava de uma lipase “verdadeira”.

Para observação do halo produzido pelo fungo endofítico *Paecilomyces* sp., não foi necessário nenhum indicador, como citado por JAEGER et al., 1999 THOMSON et al., 1999; JETTE e ZIOMEK, 1994; RAPP e BACKHAUS, 1992; SZTAJER e MALISZEWSKA, 1988, onde os testes com tributirina são geralmente avaliados pela formação de halos claros ao redor das colônias.

Estes foram sem dúvida os motivos da escolha da tributirina como substrato para lipase, a facilidade de observação da produção de enzima através da formação de halo sem necessidade de indicador e demonstração da produção de uma lipase “verdadeira” pelo fungo endofítico *Paecilomyces* sp.

Em relação ao efeito do pH a literatura cita várias faixas ótimas, isso porque o pH pode variar conforme origem e/ou isoformas produzidas pelos fungos. Neste trabalho pelo fato do fungo endofítico *Paecilomyces* sp. estar

sendo estudado pela primeira vez no aspecto enzimático, optou-se pela faixa de pH 6,0 a 8,0, pois para autores como FROST e MOSS 1987, a maioria das lipases fúngicas apresentam esta faixa ótima de pH.

Da mesma maneira que o pH, a temperatura utilizada foi a que de maneira geral é considerada ótima para a maioria dos fungos produtores de lipase. A temperatura de incubação do fungo endofítico *Paecilomyces* sp. foi de aproximadamente 28°C, temperatura esta considerada ótima segundo FROST e MOSS, 1987 onde as variações podem ser de 25° a 30°C.

Para análise da atividade enzimática que foi um dos objetivos deste trabalho, foi utilizado o método titulométrico. Como citado por KRIGER, 1995; STUER et al., 1986, é o método oficial para a determinação de atividade lipolítica. Baseando-se na titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima com um volume de NaOH ou KOH. O volume de base utilizada, em função do tempo de reação, é relacionado com a quantidade de ácidos graxos liberados e conseqüentemente com a atividade enzimática.

Na análise quantitativa da atividade enzimática da lipase utilizando o endofítico *Paecilomyces* sp. foram feitas 3 repetições titulométricas. Para estas três repetições foram usadas três placas de Petri inoculadas com o fungo endofítico *Paecilomyces* sp. contendo como meio principal tributirina. As três placas já continham halo ao redor da colônia, devido à hidrólise da tributirina. O tempo de incubação das três placas foi de 192h – 8 dias, e temperatura aproximadamente de 28°C e pH 6,5.

Os resultados obtidos para as 3 repetições foram os que seguem:

TABELA 4 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LIPASE EM U/mL (UNIDADES POR mL)

Repetições	Atividade U/mL
Placa 1	0,0295 U/mL
Placa 2	0,03 U/mL
Placa 3	0,029 U/mL
Média	0,0295 U/mL

A média da atividade enzimática da lipase para as três repetições foi de 0,0295 U/mL. Os resultados obtidos da extração enzimática da lipase por LIMA

(2000), pelo do fungo *P. auratiogriseum* utilizando o mesmo método titulométrico foi da faixa de 1,015 à 22,0 U/mL. Vale ressaltar que no trabalho de LIMA (2000), houve esta faixa de variação na atividade enzimática da lipase devido à utilização de substratos diversos, temperaturas e pHs diferentes, adições e concentrações de sais variadas e também de fontes de nitrogênios diferentes, entre outros.

Se confrontarmos os resultados obtidos por LIMA (2000) com os obtidos neste estudo, observaremos uma grande diferença de produção de atividade lipolítica dos dois fungos *P. auratiogriseum* e *Paecilomyces* sp. Em relação a essa diferença algumas observações serão discutidas a seguir.

A comparação entre os resultados dos dois trabalhos deve ser feita com muita cautela, uma vez que no trabalho de LIMA (2000) as condições de otimizações dos meios já haviam sido cumpridas e os deste trabalho estão apenas começando.

De qualquer modo, também é relatado na literatura que freqüentemente microrganismos produzem isoformas de uma mesma enzima. Dessa maneira o fungo endofítico *Paecilomyces* sp. poderia produzir isoformas diferentes dependendo de fatores como temperatura , pH , composição do meio de cultura, etc. Essa produção de isoformas diferentes pode ter sido uma das causas da atividade enzimática ter sido baixa no fungo endofítico *Paecilomyces* sp.

Estudos de purificação de lipase de *R. delemar* revelaram a presença de três multiformas: lipase A, B e C, sendo que a lipase A foi produzida em maior quantidade enquanto B e C eram produzidas complementarmente, dependendo da composição do meio de cultura. A produção de multiformas de lipases também foi notada em *Penicillium cyclopium*, e neste caso, a produção de lipases A e B estaria relacionada a variação do pH do meio de cultivo (JAEGER et al., 1994).

A fonte de nitrogênio utilizada neste estudo foi uma fonte orgânica a peptona e o extrato de carne, para muitos microrganismos fontes orgânicas de nitrogênio parecem ser perfeitas por conterem aminoácidos e outros elementos essenciais ao desenvolvimento do microrganismo e à produção de enzimas (LIMA, 2000).

Em estudos sobre o efeito da fonte de nitrogênio na produção de lipases por *P. roqueforti* (PETROVIC et al., 1990), verificou-se que com bactopectona

ou com sulfato de amônio obtinha-se a mesma atividade lipolítica, em torno de 10 U/mL, mas com tempo de cultivo diferentes, 4 e 6 dias, respectivamente.

Com *Penicillium citrinum* (KRIGER, 1995; PIMENTEL et al., 1994), observou-se maior atividade volumétrica (2,85 U/mL), utilizando-se extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Utilizando-se *Candida rugosa* (BENJAMIN e PANDEY, 1996), a maior atividade lipolítica foi obtida com a adição de 3% de peptona ao meio de cultivo.

Estudos com *Aspergillus niger* e *Penicillium citrinum* resultaram mais satisfatórios com a utilização de peptona do que com nitrato de amônio (POKORNY et al., 1994).

No trabalho de LIMA (2000), a maior atividade lipolítica deu-se com a utilização de fontes inorgânicas de nitrogênio, sulfato de amônio e nitrato de potássio, onde a atividade foi até doze vezes maior do que a obtida com adição de fontes orgânicas. Os resultados dessa produção no entanto, diferenciam-se do observado na literatura, uma vez que a obtenção de alta atividade lipolítica com fontes inorgânicas não é muito freqüentemente relatada (LIMA, 2000).

Como no presente estudo com o fungo endofítico *Paecilomyces* sp. foram utilizados peptona e extrato de carne como fontes de nitrogênio, caberia no futuro fazer testes com fontes inorgânicas, para talvez revelar um aumento da atividade enzimática devido a este componente.

Neste estudo para detecção e quantificação de lipases pelo fungo endofítico *Paecilomyces* sp. não foram levados em conta variáveis como efeito da adição de sais minerais ao meio de cultivo, tempo e temperatura de incubação, substratos diferentes como citado por LIMA (2000). É muito provável que a falta de algum destes componentes tenha interferido na produção da atividade enzimática lipolítica do fungo endofítico *Paecilomyces* sp.

Quanto à adição de sais minerais ao meio de cultivo, poderíamos dizer que são necessários para o desenvolvimento dos fungos, alguns íons que são considerados essenciais. Os grupos de sais podem ser divididos em dois grupos, os macronutrientes, como fósforo, carbono, hidrogênio, potássio, nitrogênio, enxofre, magnésio e os micronutrientes como ferro, cobre, manganês, zinco entre outros (GRIFFIN, 1994). Estudos sobre produção de lipases fúngicas citam freqüentemente alguns sais como constituintes do meio

de cultivo, com o objetivo de favorecer o crescimento microbiano e assim, aumentar a produção de lipase (LIMA, 2000).

Neste trabalho o substrato utilizado foi a tributirina, mas seriam necessários outros estudos utilizando substratos diferentes como por exemplo óleos vegetais. Segundo o trabalho de LIMA (2000), que utilizou substratos como óleo de oliva, girassol, milho, soja encontrou a atividade enzimática alta (óleo de oliva 22U/mL; milho 18U/mL) entre todos os óleos, demonstrando desta maneira que todos os óleos vegetais experimentados em seu trabalho agiram como indutores na produção de lipase por *P. auratiogriseum*.

O efeito do tempo e da temperatura de incubação também podem ter alterado a quantificação da produção de enzima lipolítica do endófito *Paecilomyces* sp.

Outras variáveis utilizando temperaturas e tempos diferentes de incubação devem ser realizados para que se possa avaliar a atividade enzimática da lipase.

5.1.3 Atividade da protease

Para detecção da atividade enzimática proteolítica do fungo endofítico *Paecilomyces* sp. foram testados dois substratos principais; gelatina e caseína (item 4.2.3).

Foram feitas quatro repetições para cada substrato, quatro se apresentaram para gelatina e quatro para caseína. Os halos formados nas oito placas não diferenciavam quanto ao tamanho para os dois tipos de substratos. A gelatina é um pouco mais difícil de ser trabalhada, pois muitas vezes requer quantidades a mais de ágar para solidificar-se, já a caseína, além de solidificar-se rápido com menos quantidade de ágar, produz halo em menor tempo, aproximadamente 5 dias enquanto que a gelatina com aproximadamente 9 dias.

Também foram feitas algumas placas com pHs diferentes, pH 3,5 para quatro placas de caseína e quatro placas de gelatina; pH 5,5 também para quatro placas de caseína e quatro placas de gelatina. Houve formação de halo para todas as placas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos no presente trabalho comprovaram a produção de enzimas quitinolíticas, proteolíticas e lipolíticas pelo fungo endofítico *Paecilomyces* sp.

Entretanto, outros aspectos ainda precisam ser estudados para uma real avaliação dos resultados obtidos neste trabalho, servindo de subsídios para futuras pesquisas como:

- Estudos da otimização dos meios de cultura para a produção das enzimas quitinases, proteases e lipases;
- Realização da quantificação enzimática da protease e quitinase do fungo endofítico *Paecilomyces* sp.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo: Brazil, 1998. 1163p.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L., ed. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. p. 117-137.

BARRETO, C. C. **Quitinases do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae***. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Genética e biologia Molecular/UFRGS, RS.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Optimization of liquid media for lipase production by *Candida rugosa*. **Bioresour. Technol.**, V.55, p.167-170, 1996.

BIDOCHKA, M. J. ; KHACHATOURIANS, G.G. Regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Exp. Mycol.** Orlando, v.12, p.161-168, 1988.

BIDOCHKA, M. J. ; KHACHATOURIANS, G.G. **J. Invert. Pathol.**, v.63, p. 7-13, 1994.

BING, L. A.; LEWIS, L. C. Occurrence of entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in different tillage regimes and in *Zea mays* L. and virulence towards *Ostrinia nubilalis* (Hübner). **Agriculture Ecosystems and Environment**, v. 45, p. 147-156, 1993.

BOTTON, B.; EL BADAQUI, K.; MARTIN, F. Induction of extracellular proteases in the ascomycete *Cenococcum geophilum*. In: Gianinazzi-Person, V; Gianinazzi, S. *Mycorrhizae: Physiology and genetics aspects of mycorrhizae*, INRA-Paris, p.402-406, 1985.

BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C. e LATGE, J.P. **Appl. Environ. Microbial.** v.54, p.1795-1805, 1998.

BUZZI, Z. J.; MIYAZAKI, R. D. **Entomologia didática**. Ed. Curitiba, p. 308, 1999.

BRAGA, A.A.; OLIVEIRA, J.S.; LINARDI, V.R. Purificação parcial de proteinases extracelulares produzidas por *Metarhizium anisopliae*, Universidade Federal de Minas Gerais; Belo Horizonte, M.G. **XX Congresso Brasileiro de Microbiologia**, p.235, 1999.

BRAGA, G.U.L.; VENCovsky, R.; MESSIAS, C.L. Estimates of genetic parameters related to chitinase production by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Universidade Estadual de Campinas, SP, v.21, p.171-177, 1998.

BROCKMAN, H.L. General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In: Borgstrom, B. e Brockman, H.L. (Eds.). **Lipases**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 1-46, 1984.

CABIB, E. The synthesis and degradation of chitin. **Adv. Enzymol**, 1987.

CHARNLEY, A.K.; ST. LEGER, R.J. The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: COLE, G.T.; HOCH, M.C., ed. **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. New York: Plenum Press, p.267-286, 1991.

CLARKSON, J. M.; CHARNLEY, A. K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insect. **Trends Microbiol.** v. 4. p. 197-203. 1996.

CRUZ, L. C. H. **Micologia Veterinária**. Itaguaí: UFRJ, Imprensa Universitária, p. 202, 1981.

DE LA CRUZ, J.; HIDALGO-GALLEGO, A.; M.LORA, J.; BENITEZ, T.; PINTOR-TORO, J.A.; LLOBEL, A. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. **Europ. J. Biochem.** v. 206 p. 859-867. 1992.

EI SAYED, G.N.; COUDRON, C.M.; IGNOFFO e RIBA Chitinolytic activity and virulence associated with native and mutant isolates of an entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **J. Invertebr. Pathol.** v.54 p. 394-403, 1989.

FARLEY, P.C.; IKASARI, L. Regulation of the secretion of *Rhizopus oligosporus* extracellular carboxyl proteinase. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v.138, p.2539-2544, 1992.

FLACH, J.; PILET, P.E.; JOLLES, P. What's new in chitinase research? **Exper.** v. 48 p. 90-96. 1992.

FOKKEMA, N.J.; VAN DEN HEUVEL, J. ed. **Microbiology of the phylloplane**. Cambridge University Press, 1986.

FROST, G.M.; MOSS, D.A. Production of enzymes by fermentation. **Enzyme technol.**, v.7, p.112-121, 1987.

GOODAY, G. **The ecology of chitin degradation**. **Microb. Ecol.**, 1990.

GOODAY, G.H.; ZHU, W.Y.; DONNELL, R.W. What are the roles of chitinases in the growing fungus? **Fems: Microbiol. let.** v. 100 p. 387-392. 1992.

GUPTA, S.C.; LEATHERS, T.D.; SAYED, G.N.; IGNOFFO, C.M. **J. Invert. Pathol.** v.64, p.13-17, 1994.

ISSAC, S. **Fungal-plant interactions**. London: Chapman e Hall, p.418, 1992.

JAEGER, K.E.; RANSAK, S.; KOCH, H.B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B.W. Bacterial lipases. **FEMS Microbiol. Ver.**, v.15, p.29-63, 1994.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications os lipases. **Annu. Ver. Microbiol.**, v53, p.315-351, 1999.

JETTE, J.F.; ZIOMEK, E. Determination of lipase activity by a rhodamine-triglyceride-agarose assay. **Anal. Biochem.**, v.219, p.256-260, 1994.

KHAN, M. T.; ROUFOGALIS, B.D. Understanding the role of proteinases through a ubiquitous enzyme complex, the multicatalytic proteinase (MCP). **Biochem. Edu.**, Oxford, v.22, p.114-120, 1994.

KRIEGER, N. Produção, Purificação e Caracterização de lipases de *Penicillium citrinum*, Tese de Doutorado- departamento de Bioquímica, Setor de Ciências biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 260f., 1995.

LAVERLAM, S.A. Cali-Colômbia

http://cali.cetcol.net.co/~laverlam/e_index.html. 1999.

LIMA, V.G. Lipases de *Penicillium aurantiogriseum*, Tese de Mestrado - departamento de Bioquímica, Setor de Ciências biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba., 2000.

MALCATA, F.X.; REYES, H.R.; GARCIA, H.S.; HILL, C.G.; AMUNDSON, C.H. Kinetics and mechanisms of reaction catalysed by immobilised lipases. **Enzyme Microb. Technol.**, v.14, p. 426-446, 1992.

MARTINELLE, M.; HULT, K. Kinetics of triglyceride lipases. In: Wooley, P. e Petersen, S.B. (Eds.). **Lipases: Their Structure, Biochemistry and Applications**. U.K.: Cambridge University Press, p.159-180, 1994.

MARZLUF, G.A. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.45, p. 437-461, 1981.

MELO, I.S. ; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. Jaguariúna,SP: EMBRAPA Meio Ambiente, 388 p., 2000.

MORAES, AML; MOMEN, H & ZAHNER, V. Análise isoenzimática de espécies de *Aspergillus* sp. seção *CIRCUMDATI*, isoladas de insetos, Fundação Oswaldo Cruz- Rio de Janeiro, **XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**, p.209, 2001.

MOREIRA, C.A. Regulação da secreção de proteínas do entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Brasília, D.F. 1998.

NORTH, M. J. Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. **Microbiol. Ver.**, Washington, v.46, p.308-340, 1982.

OHNISHI, K.; YOSHIDA, Y.; SEKIGUCHI, J. Lipase production of *Aspergillus oryzae*. **J. Ferment. Bioeng.**, v.77, p.490-495, 1994.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V.T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v.29, p.119-131, part 2, 1999.

PARIS, S. ; FERRON, P. Study of the virulence of some mutants of *Beauveria Brongniartii* (Syn *Beauveria tenella*). **J. Invertebr. Pathol.** 34^a ed. 133-145, 1979.

PARIS, S. e SEGRETAIN, G., Étude de l'activité lipasique esterasique intracellulaire de *B. tenella*. **Annales de Micrologie**. v. 129 p. 71-77, 1978.

PATERSON, I.C.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M.; CLARKSON, J.M. Specific induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Ciência e Cultura**. v.45 p. 200-205. 1994.

PETROVICH, S.E.; SKRINJAR, M.; BECAREVIC, A.; VUJICIC, I.F.; BANKA, L. Effect of various carbon sources on microbial lipases biosynthesis. **Biotechnol. Lett.**, v.12, n.4, p.299-304, 1990.

PIMENTEL, M.C.B.; KRIEGER, N.; COELHO, S.C.C.B.; FONTANA, J.O.; MELO, E.H.M.; LEDINGHAM, W.M.; LIMA-FILHO, J.L. Lipase from a brazilian strain of a *Penicillium citrinum*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.49, n.1, p.59-74, 1994.

PIMENTEL, I. C. Fungos Endofíticos do milho (*Zea mays* L.) e de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e seu potencial biotecnológico no controle de pragas agrícolas. Paraná, UFPR. Tese de Doutorado. 2001.

PINTO, A. S.; BARRETO, C.C.; SCHRANK, A.; ULHOA, C. J. U.; VAINSTEIN, M. H. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Can. J. Microbiol.** v.43 p. 322-327. 1996.

PINTO, F.G.S.; JANKEVICIUS, S.I.; FUNGARO, M.H.P.; FERREIRA, J.M.; FURLANETO, M.C. Caracterização parcial de proteases do fungo entomopatogênico *Metarhizium flavoviride*, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Cascavel, PR., Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR. **XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**, p.16, 2001.

POKORNY, D.; FRIEDRICH, J.; CIMERMAN, A. Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. **Biotechnol. Lett.**,v.16, n.4, p.363-366, 1994.

REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. **Endophytic fungi in grasses and woody plants**. St. Paul: The American Phytopathological Society Press, 1996. 223 p.

RAPP, P.; BACKHAUS, S. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v.14, p. 938-943, 1992.

REVISTA – **BIOTECNOLOGIA Ciência & Desenvolvimento**, nº23, p.32-37, novembro/dezembro 2001.

ROBINSON, R. K. Studies on penetration of insect tegument byn fungi. **Pest Art.**, New Summ., Sect. B. v.12 p. 131-142.1966.

SANDHU, S.S.; USHA-CHANDRASEKHARAN; RAJAK, R.C.; MATHEW, S.O.; CHANDRASEKHARAN, U. Autolytic enzymes of two entomopathogenic fungi for the isolation of protoplast, v.69, p.177-181, 1999.

SAYED,G.N.; IGNOFFO, C.M.; LEATHERS, T.D. e GUPTA, S.C.
Mycopathologia v.122, p.143-147, 1993.

SCHRANK, A.; BASSANESI, M.C.; PINTO JR, H.; COSTA, S. V.; BOGO, M. R.; SILVA, M.S.N. Superoxide dismutases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Ciência e Cultura**. v.45 p. 200-205. 1993.

SHELLEY, A.W.; DEETH, H.C.; MACRAE, I.C. Review methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. **J. Microb. Methods**, v.6, p.123-137, 1987.

SINGH, A.; GHOSH, V.K.; GHOSH, P. Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.18, p.177-180, 1994.

SOUZA, R.F.; GOMES, R.C.; ALVIANO, C.S.; FERREIRA, M.S.; COELHO, R.R.R. & SOARES, R.M.A. Purificação e caracterização de uma endoquitinase produzida pelo *Colletotrichum gloeosporioides*. Universidade do Rio de Janeiro, Departamento de Microbiologia geral. **XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia** , p.40, 2001.

E-mail: rsouza@micro.ufrj.br

SPACKI, V.; BERTO, C.P.; PEREIRA, P.M.; PAVANELLI, W.R.; ALVES, L.F.A.; PINTO, F.G.S. Análise da Produção de proteases extracelulares e compatibilidade a produtos fitossanitários apresentada pelos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Cascavel, PR. **XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**, p.10, 2001.

STIRLING, J.; COOK, G.; POPE, A. Chitin and its degradation. In: Fungal wall and hyphal growth. **British Mycological Society**. p. 169-188. 1979

ST. LEGER, R. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Cuticle-degrading enzymes from entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticles. **J. Invertebr. Pathol.** 47^a ed. 295-302. 1986.

ST. LEGER, R. J.; FRANK, D. C.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. Molecular cloning e and regulatory analisys of the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Eur. J. Biochem.** v. 204 p. 991-1001. 1992.

ST. LEGER, R. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R.M. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 253 p. 221-232. 1987.

ST. LEGER, R. J.; DURRANDS, P.K.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R.M. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. **J. Invert. Pathol.** v.52 p.285-293. 1988.

ST. LEGER, R. J.; BUTT, T. M.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D. W. Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Gen. Microbiol.** v.136 p. 1779-1789. 1990.

ST. LEGER, R. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R.M. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Invert. Pathol.** v.58 p. 415-426. 1991a.

ST. LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. A model to explain differentiation of appressoria by germlings of *Metarhizium anisopliae*. **J. Invert. Pathol.** v.57 p. 299-310. 1991b.

ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. Construction of na improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.50 p. 183-212. 1996.

STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. Purification of extracelular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v.168 p.1070-1074, 1986.

SZTAJER, H.; MALISZEWSKA, I. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v.10, p.492-497, 1988.

THIVEND, P.; MERCIER, C.; GUILOT, A. Dosage de L'amidon dans les milieux complexes. **In Na. Biol. Arum**, v.4, p.513-520, 1965.

THOMSON, C.A.; DELAQUIS, P.J.; MAZZA, G> Detection and Measurement of microbial lipase activity: a review. **Crit. Ver. Food Sci. Nutr.**, v.39, p.165-187, 1999.

VERGER, R. Enzyme kinetics of lipolysis. **Methods Enzymol.**, v.64, p.340-392, 1980.

VERGER, R. E DE HAAS, G.H. Interfacial enzyme kinetics of lipolysis. **Ann. Ver. Biophys. Bioeng.**, v.5, p.77-117, 1976.

WEN, F.H.; YUEH-CHAING L. **J. Chia. Yins. Agri.** v.44, p.101-116, 1996.